

KÍSÉRLETI ÉS KLINIKAI KUTATÁS

Magyar Onkologia 19. 154—161, 1975.

A Szegedi Orvostudományi Egyetem Szemklinika és Mikrobiológiai Intézete

A szem melanoma malignum-jának neuroectodermalis eredetéről, catecholamin-tartalmáról és antigen természetéről

KAHÁN ÁGOST dr., PUSZTAI ROZÁLIA dr.,
BÉLÁDI ILONA dr., MÁLNÁSI ZSUZSANNA dr.
és HAMMER HELGA dr.

A rosszindulatú melanomát éppen *Masson* által postulált neuroectodermalis eredete miatt nevezzük ma így, és nem melanosarcomának; kevés adat áll rendelkezésre azonban arra vonatkozólag, hogy mily idegi structurával áll histogenetikai kapcsolatban. E kérdéssel kapcsolatos vizsgálataink kiindulópontja az antibioticum-korszak előtt a sepsis ellen irányuló szerencsétlen kimenetelű therapiás próbálkozásokból, majd állatkísérletekből közismert pusztító hatás volt, melyet a natrium jodat a szemben a pigmentepithelre és a melanocytákra is kifejt (*Riehm, Vito*). *Szent-Györgyi* vizsgálataiból derült ki, hogy a jodat a posganglionaris sympathikus „chromaffin” szövetek catecholamin tartalmát oxidálva, azokban jellemző barna elszíneződést hoz létre, akárcsak a chromatichromat kezelés. Kézenfekvő volt annak feltételezése, hogy az uvea melanocytáit is a jodat azok nagy catecholamin tartalma miatt károsítja, és így a melanoma is chromaffin szövet módjára viselkedik. Ezért vizsgálat tárgyává tettük:

1. a chorioidea melanoma malignumának noradrenalin tartalmát és kötőmódját;
2. a melanoma sejtek viselkedését szövettényészetben;
3. a szövettényészetnek a szervezet immun-behatásaitól mentes melanoma sejtei alkalmasnak látszóttak a melanoma ellenes immunreactiók tanulmányozására.

Módszerek

1. Melanoma malignum chorioideae utólag szövettanilag igazolt gyanúja miatt eltávolított szemek melanomáinak és a felettük fekvő retina-résznek, valamint a post mortem 2 órában belül eltávolított kontroll szövetek noradrenalin tartalmát azok perchlorsavas extractumából a trihydroxyindol reactioval határoztuk meg *O'Hanlon és mtsai* módszere szerint. — A noradrenalin sialsavhoz történő kötődésének tanulmányozására *Suzuki* szerint praeparált agy-gangliosida és *Brunngraber és Brown* szerint izolált agy-sialoglycoprotein keverékének vizes emulsiójával incubáltunk noradrenalin, és az így nyert termék 1 µg noradrenalin tartalmú részét, valamint 1 µg noradrenalin phenol-vizes (3 : 1) solvensben papíron leszállólag chromatographáltunk, majd *Falck, Hillarp és mtsai* szerint hívtuk elő a paraformaldehiddel bepermetezett silicagel-G réteggel bevont üveglapok közé zártan hevített chromatogramokat. — A melanoma malignumok, valamint a melanoma malignumot tartalmazó szemek csarnokvizének sialsav tartalmát *Warren* thioarbitursavas módszerével határoztuk meg.

2. Sejt-cultura készítése céljából az izolált melanoma darabot többször mostuk Hanks oldattal, feldaraboltuk és 0,2%-os DIFCO trypsinnel emésztettük. A sejtekből jeni kémcsovekben tenyésztet készítettünk, tápfolyadéként *Eagle*-féle „basal medium”-ot használtunk, mely 10% tryptose phosphat levest (Bacto) és 20% foetalis borjúsavót is tartalmazott.

3. A tenyésztett melanoma sejtek felszíni antigenjeinek kimutatására azok aethanollal tárgylemezre fixált készítményeit a melanoma hordozók, ill. normális kontroll egyének savójával kezeltük, majd a savót lemosva FITC-jelzett antihuman IgG-IgM kecskesavóval, és a készítmények fluorescentiáját Reichert-fluorescentia microscoppal vizsgáltuk. — A lymphocyták cytotoxicus hatásának vizsgálatára az elsődleges melanoma sejtenyésztet trypsinnel emésztettük. Az így nyert sejt-suspensióból olyan hígítást készítettünk, mely 5×10^4 sejtet tartalmazott 0,25 ml tápfolyadékban. Ehhez a vizsgálandó egyének citráttal levett véréből ülepítéssel nyert 10^7 fehérvérsejtet adtunk 0,25 ml tápfolyadékban. A sejtkeveréket 35 mm átmérőjű műanyag Petri-csészében, 36 °C-on, 5% CO₂-t tartalmazó levegőben incubáltuk. A lymphocytáktól nem károsított melanoma sejtek a tenyésztő-edény fenekére tapadtak, a károsítottak a tápfolyadékban lebegtek. 48 órási incubálás után a tápfolyadékot leöntöttük, és a tenyésztő-edény fenekére tapadt sejteket trypsinnel leemésztve, számukat Buerker kamrában megszámoltuk. Így módszerrel melanoma hordozók, normális kontrollók, ill. 4 uvea pigment ellen irányuló autoimmun eresburok-gyulladásban szenvedő beteg lymphocytáinak cytotoxikus hatását hasonlítottuk össze. — Az uveapigment ellen irányuló autoimmun uvea-gyulladás esetei közül 2 sympathiás ophthalmia, 2 Vogt-Koyanagi-Harada syndroma *Kahn és mtsai* által ismertetett esete volt. Az autoimmun folyamatot a betegek véréből izolált lymphocyták culturájában uvea-pigmenttel létrehozott, és a ³H-thymidin incorporatio fokozódásával mért blastos transformatioval (*Hammer*) és ugyanezen antigennel létrehozott leukocyta migratio-gátlással (*Hammer*) igazoltuk.

Eredmények

1. A melanoma feletti retina egy nagyságrenddel több noradrenalin tartalmaz, mint a normális agy vagy retina, és a melanoma 2–3-szor többet, mint a melanocytái révén már noradrenalin-dúsabb chorioidea (1. ábra).

A gangliosidák és sialomucopolysaccharidák keverékével incubált noradrenalin egy része azok végálló sialsavához kötődve, az így képződött termékek Rf értéke megváltozik: nagyobb, ill. kisebb lesz, mint a szabad noradrenaliné (2. ábra).

A melanoma sialomucoid-sialsav tartalma igen nagy: 102 mg/100 g. E neuraminsav-tartalmú glycoprotein a csarnokvízbe is bejut, középértékben 5,3 mg/100 ml mennyiségben, míg a normális csarnokvízben csak 0,7 mg/100 ml található (I. tábl.).

I. TÁBLÁZAT

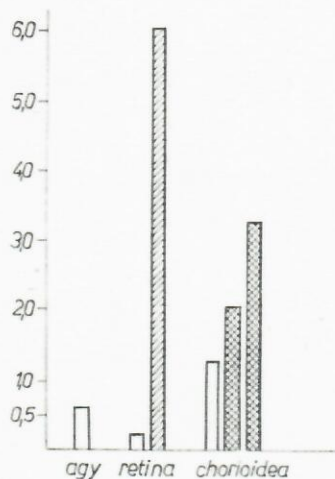
Melanoma malignum-os (M) és kontroll (K) minták sialoglycoprotein tartalma (neuraminsav mg 100 g)

1 M-daganat	102,0
2 M-csarnokvíz	11,0
3 M-csarnokvíz	6,0
4 M-csarnokvíz	5,1
5 M-csarnokvíz	4,5
6 M-csarnokvíz	3,0
7 M-csarnokvíz	2,4
8 K-csarnokvíz	0,7

2. Jelentős noradrenalin tartalmán túl a melanoma malignum-sejt postganglionaris sympathikus neuron természete a szövettenyésztés során válik szembetűnővé:

— nehezen tenyésztethető, csak 20% foetalis borjúsavóval kiegészített tápfolyadékban nő, néhány hónap múlva a szövettenyésztet egyre sejtsegregényebbé válik;

□ normális agy retina és chorioidea
 ▨ valamint 2 melanoma és a felette
 ▩ fekvő retina noradrenalin tartalma
 µg/g



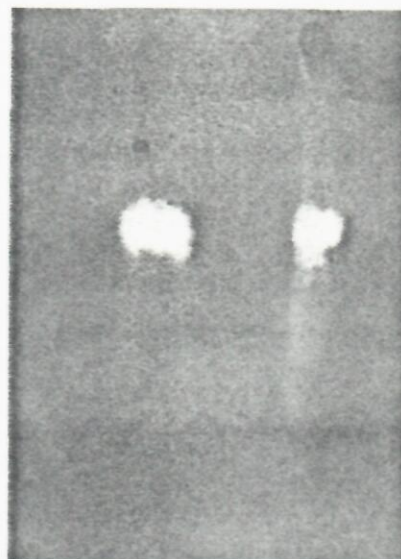
1.

1. ábra

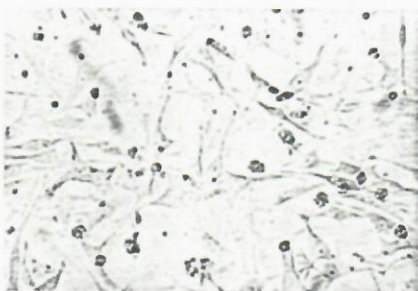
Kontroll-szövetek, melanomák és a melanoma feletti retina noradrenalin tartalma

2. ábra

Baloldalt 1 µg noradrenalin, jobboldalt sialoglycoprotein-gangliosida keverékkel incubált 1 µg noradrenalin chromatogramja (phenol-víz solvens, paraformaldehid hevítéssel előhívás)



2.



3. ábra

Melanoma malignum chorioideae szövettényészete



4. ábra

Melanoma malignum szövettényészete egy sejtjének electronmicroscopos képe (64 000X)

- szövettanyészetben a sejtek elágazódó neuron-alakot öltenek (3. ábra);
- a sejtek viszonylag távol egymástól helyezkednek el (contact inhibitio);
- szembetűnő volt a tenyészet sejtjeinek electronmicroscopos felvételein (4. ábra) az igen vastag osmiophil cytomembrana, mely a noradrenalin kötődési helyének felelhet meg.

3. Az indirect immunfluorescentiás vizsgálatok tanúsága szerint (5. ábra) a melanoma hordozók savójában levő immunglobulinok a melanoma sejtek felszínéhez kötődnek, amit az FITC-jelzett antihuman IgG-IgM fluorescentiája jelez. E felszíni fluorescentia körülveszi a sejteket, és egyes helyeken különösen kifejezett, míg kontroll savó alkalmazása esetén alig látszik fluorescentia (6. ábra).



5.

5. ábra

Melanoma malignum-hordozó vérsavójában levő immunglobulin kötődése a melanoma-szövettanyészet sejtjeinek felszínéhez, FITC-jelzett antihuman IgG-IgM fluorescentiájával láthatóvá téve



6.

6. ábra

Kontroll-savóval kezelt megfelelő készítmény

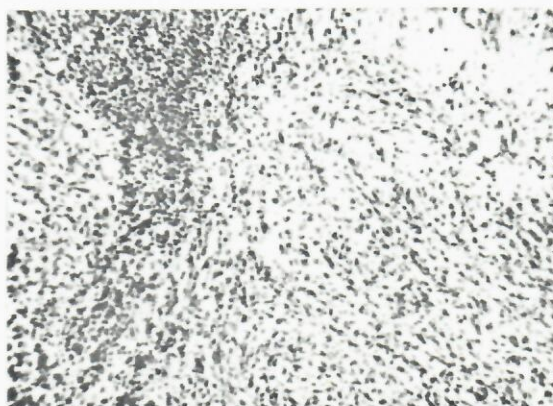
A lymphocytás beszűrődés a jórészt amelanotikus melanomákban a melanin tartalmú részekre korlátozott (7. ábra). — A szövettanyészetben a lymphocyták melanoma-sejt károsító, letapadást gátló hatását vizsgálva kiderült, hogy a kontroll lymphocyták is csökkentették kis mértékben a letapadást (8. ábra), a melanoma hordozóé kevésbé (9. ábra), a pigment elleni autoimmun uvea-gyulladásban szenvedők lymphocytái azonban odatódultak a melanoma sejtekhez és azoknak csak árnyéka maradt kivehető (10. és 11. ábra). A lymphocyták melanoma-sejt károsító hatását mennyiségileg tünteti fel a II. táblázat, a nem károsított, a tenyésztő edény fenekén letapadva maradt sejtek számát megadva. — Az uvea-gyulladás autoimmun természetét mind a 4 esetben (2 sympathiás ophthalmia, 2 Vogt—Koyanagi—Harada syndroma)

II. T Á B L Á Z A T

Különböző kórképekben szenvedő, ill. kontroll egyénekből izolált lymphocyták hatása 5×10^4 sejtszámmal indított melanoma tenyésztetre

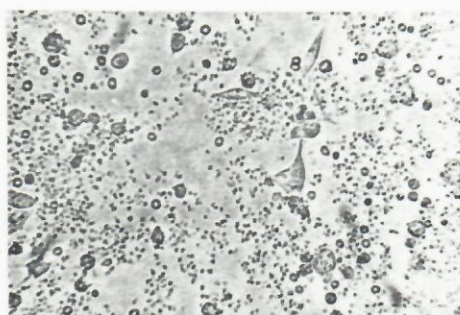
Tenyé- szetek sorszama	Lymphocyták eredete	Nem károsított („kiült”) sejtek száma
1	melanoma	2.3×10^4
2	VKH*	0
3	sy. o.**	0
4	kontroll	1.3×10^4
5	kontroll	3×10^3
6	kontroll	3×10^3
7	lymphocyták hozzáadása nélkül	3.3×10^4
8	lymphocyták hozzáadása nélkül	4×10^4

VKH* = Vogt—Koyanagi—Harada-syndroma
sy. o.** = sympathias ophthalmia

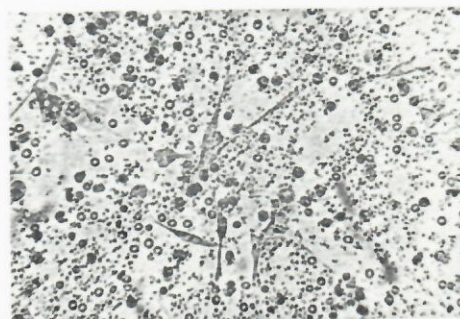


7. ábra

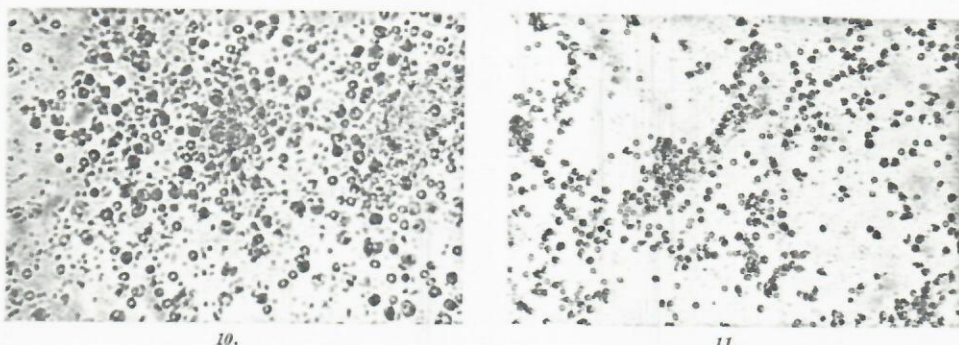
Jórészt amelanotikus melanoma malignumnak a pigment-tartalmú részekre korlátozott lymphocytás beszűrődése



8.

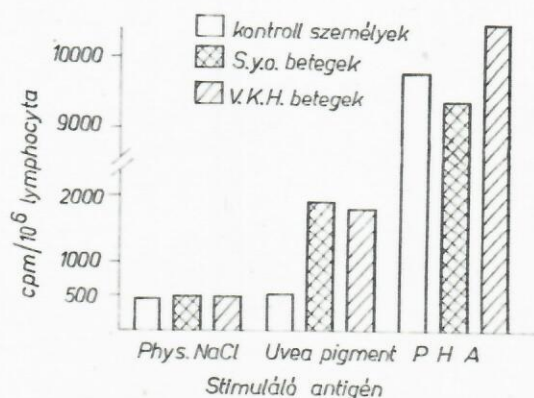


9.



8—11. ábra

Kontroll (8. ábra), melanoma hordozó (9. ábra) és pigment-ellenes autoimmun betegségben szenvedők (10. és 11. ábra) lymphocytáinak hatása a melanoma malignum-szövettenyésztésre



12. ábra

Kontroll, sympathiás ophthalmiás (sy. o.) és Vogt—Koyanagi—Harada syndromás betegek 0,9% NaCl oldat, vagy uveapigment, ill. phytohaemagglutinin jelenlétében $3 \mu\text{C } ^3\text{H-thymidinnel}$ tenyésztett lymphocytáiból TCA-val kicsapott DNS-ének beütésszámai

igazolta, hogy e betegek lymphocytaculturái uvea pigment hozzáadására blastos átalakulást mutattak (12. ábra), és ugyanezen antigen hatására a leukocytamigratio gátlás is bekövetkezett.

Megbeszélés

Az ismertetett eredmények összefüggését és jelentőségét a melanoma-ellenes immunreakciók szempontjából kívánjuk kidomborítani.

A melanoma malignum nagy noradrenalin tartalma és nehezen tenyésztethő sejtjeinek a szövettenyésztésben fokozatosan kialakuló neuron alakja e daganat sympathikus eredetére utal. Jellemző a melanoma nagy sialoglycoprotein tartalma is, mely anyag a cytomembrana legkülső rétegét szokta alkotni (glyco-calix), és összhangban van a tenyésztett melanoma sejtek jelentős contact

inhibitiojával is, felszínük ultrastructuralis képével is. Adatokat szolgáltatunk a glycocalix sialsav végződéseinek noradrenalin-kötő természetéhez, és indirect immunfluorescentiás vizsgálataink szerint a melanoma hordozók tumor-specifikus immunglobulinjai is ugyanide, a cytomembrana felszínéhez kötődnek. Feltételezésünk szerint a noradrenalin hordozó sialsav-dús glycoprotein a melanoma sejtek felszíni (membran-) antigenje, mely ellen a humoralis immun-válasz irányul.

Hellström és Hellström szerint a daganat sorsa szempontjából a humoralis immunreakciónál lényegesebb a cellularis válasz. Ennek célpontja a melanoma esetén szintén 1-DOPA származék: a melanin pigment. E targettel szemben vizsgálataink szerint a melanoma hordozók lymphocytái kevésbé reaktívak, mint a normális kontrollokéi, ezért is lettek melanoma hordozók a kisebb mértékű „immunsurveillance” következtében. Óriási melanoma-sejt-pusztító hatásuk van viszont eredményeink szerint az uveapigment ellenes autoimmun uveagyulladásokban (sympathiás ophthalmiában, Vogt—Koyanagi—Harada szindrómában) szenvedők lymphocytáinak.

Eredményeinkből a melanoma malignum immuntherapiájának 2 lehetséges útja rajzolódik ki:

a) uveapigment ellenes autoimmun uveagyulladásban szenvedők izolált lymphocytáinak infúziója, vagy még inkább helyi alkalmazása;

b) abból kiindulva, hogy a melanoma eredete szempontjából magzati állapotban levő sympathikus structura, növekedése minden bizonnyal „idegnövekedési factorral” (nerve growth factor, *Levi—Montalcini*) fokozható volna (ezért is nő szövettényészetben ennek híján nehezen), míg az idegnövekedési factorral szemben termelt ellenanyaggal a felnőtt szervezet egyetlen magzati sympathikus structurájának, a melanomának immunsympathectomiája, elpusztítása volna lehetséges.

Összefoglalás

Magas noradrenalin-tartalma és szövettényészetben mutatott tulajdonságai alapján a rosszindulatú melanoma magzati sympathikus structurának felel meg. — A felszíni antigenje noradrenalin kötő sialsav-dús glycoprotein, mely ellen irányuló humoralis immun-válasz csak a melanoma hordozókban található. — A rosszindulatú melanoma ellen irányuló cellularis „immunsurveillance” melanoma hordozókban kisebb mértékű, mint a normális egyénekben, és a pigment ellen irányul. Az uveapigment ellenes autoimmun eresburok gyulladásokban szenvedők lymphocytáinak igen nagymértékű melanoma-sejt pusztító hatásuk van.

Irodalom

- Brunngraber, E. G., Brown, B. D.*: Biochem. J. 103, 65 (1967). — *Eagle, H.*: Science 122, 501 (1955). — *Falck, B. N., Hillarp, A., Thieme, G., Torp, A.*: J. Histochem. Cytochem. 10, 348 (1962). — *Hammer, H.*: Brit. J. Ophthal. 55, 850 (1971). — *Hammer, H.*: Brit. J. Ophthal. 58, 773 (1974). — *Hellström, K. E., Hellström, I.*: Adv. Cancer Res. 18, 167 (1969). — *Kahán, A., Sztanojevits, A., Szabados, T., Vass, Z., Szabó M.*: Graefes Arch. Ophthal. 167, 246 (1964). — *Levi-Montalcini, R.*: Science 144, 105 (1964). — *Masson, P.*: Ann. d'anat. path. 3, 417, 657 (1926). — *O'Hanlon, J. F., Campuzano, H. C., Horvath, S. M.*: Anal. Biochem. 34, 568 (1970). — *Riemh, W.*: Klin. Mbl. Augenheilk. 78, 87 (1927). — *Suzuki, K.*: J. Neurochem. 12, 629 (1965). — *Szent-Györgyi, A.*: cit. *Boyd, J. D.*: Adrenergic Mechanisms (ed. J. J. Vane, Wolstenholme, G. E. W., O'Connor, M.) Churchill, London, 1960, p. 63. — *Vito, P.*: Boll. Ocul. 14, 945 (1935). — *Warren, L.*: J. biol. Chem.: 234, 1971 (1959).

Кахан А., Пустай Р., Белади И., Мальнаши Ж., Хаммер Х.: О невро-эктодермальном происхождении, содержании катехоламина и антигенной природы злокачественной меланомы глаза.

На основании большого содержания норадреналина и особенностей, наблюдаемых в тканевой культуре, злокачественная меланома соответствует эмбриональной симпатической структуре. Поверхностный антиген опухоли является богатым в сialic acid гликопротеином, связывающим норадреналин. Гуморальная иммунологическая реакция против этого антигена может быть выявлено только у людей, являющихся носителями злокачественной меланомы. Целлюлярная иммунологическая реакция против злокачественной меланомы в носителях этой опухоли менее выражено, чем у нормальных людей и направлена против пигмента. Лимфоциты лиц, страдающих с аутоиммунным хориоидитом с антигенами против пигмента увеальной оболочки, обладают эффектом, нарушающим клетки меланомы.

Kahán, A., Pusztai, R., Béládi, I., Málnási, Zs., and Hammer, H.: Studies on neuroectodermal origin of the malignant melanoma of the eye, its catecholamine content and antigen character.

The malignant melanoma corresponds to a fetal sympathetic structure according to its high noradrenaline content and its character shown in tissue culture. Its surface antigen is a glycoprotein rich in sialic acid binding noradrenaline, and against which immune response can be seen only in melanoma carriers. The cellular immunosurveillance against malignant melanoma is weaker than in normal individuals, and is directed against the pigment. The lymphocytes of autoimmune uveitis-patients with antibodies against uveal pigment have marked melanocyte destroying effect.